

酱香型大曲的理化指标、水解酶系、微生物产酶的关系研究

胡宝东¹, 邱树毅¹, 周鸿翔¹, 王晓丹^{1,2}

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳 550025)

(2. 贵州大学生命科学学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 酱香型大曲是典型的高温大曲, 本文主要对酱香型大曲的理化指标以及水解酶系的种类和酶活力进行测定。研究发现, 酱香型大曲的理化指标符合地方标准 DB 52/T 871 的规定; 酱香型大曲中水解酶系主要为蛋白酶、淀粉酶和果胶酶。结合酱香大曲的水解酶系实验结果和原料小麦的成分, 对已从酱香型大曲分离鉴定的 19 株细菌和 17 株霉菌进行产酶实验, 测定其产酸性蛋白酶、中性蛋白酶、糖化酶、纤维素酶、果胶酶和脂肪酶的能力。研究发现, 水解酶系能够部分反映出曲中微生物的种类和数量; 甲基营养型芽孢杆菌、黄曲霉和阿姆斯特丹散囊菌对酱香型大曲水解酶系贡献比较突出。将功能微生物制作成酶制剂, 可用于提高酱香大曲的品质, 为优化制曲工艺和强化大曲的制备提供理论依据。

关键词: 酱香型大曲; 理化指标; 水解酶系; 微生物产酶

文章编号: 1673-9078(2017)2-99-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.016

Relationships among Physiochemical Indices and Hydrolyzing Enzyme Systems and Enzymes-produced-ability in Jiangxiang Daqu

HU Bao-dong¹, QIU Shu-yi¹, ZHOU Hong-xiang¹, WANG Xiao-dan^{1,2}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biological Pharmacy, School of Liquor-making and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China) (2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Jiangxiang Daqu is a typical high-temperature Daqu. The physiochemical indices and the types and activities of the hydrolyzing enzymes present in Jiangxiang Daqu were assessed. The results showed that the physiochemical indices of Jiangxiang Daqu met with the requirements of local standards, DB 52/T 871, and the major enzymes present in it were protease, amylase, and pectinase. The results of the experiments to determine the hydrolyzing enzymes and components of wheat (the raw material) showed that 19 strains of bacteria and 17 strains of mold were isolated from Jiangxiang Daqu. These were used to conduct the enzyme production experiment, and capacities of these microorganisms to produce acid protease, neutral protease, saccharifying enzyme, cellulase, pectinase, and lipase were measured. The results suggested that the hydrolyzing enzymes could partially reflect the structure and quantity of microorganisms in the Daqu; *Bacillus methylotrophicus*, *Aspergillus flavus*, and *Eurotium amstelodami* were the major contributors to the hydrolyzing enzymes in Jiangxiang Daqu. The enzymes prepared by functional microbes could be used to improve the quality of Jiangxiang Daqu. These findings provide a theoretical foundation for the optimization of the Daqu-making technique and the preparation of intensified Daqu.

Key words: Jiangxiang Daqu; physiochemical indexes; hydrolyzing enzymes; enzyme produced by microorganism

收稿日期: 2016-01-20

基金项目: 科技部科技支撑计划项目课题 (2011BAC06B12); 贵州省重大专项项目 (黔科合重大专项字[2013]6009号); 贵州省工业攻关项目 (黔科合 GZ 字[2014]3012); 贵州省省校合作计划项目黔科合 LH 字[2014]7672

作者简介: 胡宝东 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程与酿造科学

通讯作者: 王晓丹 (1980-), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向: 应用生物技术

酱香型酒大曲是以纯种小麦为原料制成的含有多种微生物和酶的酶制剂, 它是典型的高温大曲。小麦作为制备酱香型大曲的原材料, 其主要成分为淀粉、蛋白质、脂肪、纤维素和半纤维素等。在大曲的制作以及贮存的过程中, 大曲中的微生物会代谢产生一系列的酶, 如酸性蛋白酶、中性蛋白酶、液化酶、糖化酶、纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、脂肪酶、单宁酶和植酸酶等, 进而形成了酱香型大曲的水解酶系^[1]。

水解酶系将原料中大分子物质降解成为小分子物质,供微生物生长利用^[2,3]。另外,有一些代谢产物是白酒中香味物质或者为香味物质提供前驱物质,这些代谢产物是酱香型白酒风格特征的来源,并且对白酒有重要的增香作用。

酱香型大曲的理化指标是考察大曲是否发酵成熟,反映着大曲的品质。酱香型大曲中微生物多样性高,对于酱香型大曲中微生物产酶的研究,目前主要集中在细菌和霉菌,并且都是微生物产单一酶系的研究^[4,5]。有文献报道,液化酶和蛋白酶主要是由细菌和霉菌产生,而糖化酶主要是由根霉、黑曲霉等霉菌产生^[6,7]。水解酶系对于酿酒发酵及白酒风格特征的形成有着重要的意义。其中淀粉酶类降解原料中淀粉,不仅有利于微生物的生长和代谢,而且有利于酒精的形成;蛋白酶类降解原料中蛋白质,使氨基酸含量增加,有利于微生物的生长代谢,同时可以强化酵母菌的酒精代谢,提高白酒中香味物质含量;脂肪酶的降解产物也与白酒中一些风味物质的形成有关;纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶共同作用降解原料中纤维素、半纤维素和果胶等物质,使淀粉更容易被降解;单宁酶降解原料中的单宁,降低了白酒的苦涩感;植酸酶水解植酸盐,植酸盐的存在会抑制一些酶的活性^[8-11]。

对酱香型大曲中理化指标和水解酶系进行测定,并对课题组从酱香型大曲中分离鉴定的 19 株细菌和 17 株霉菌进行产酶实验,找出对酱香大曲水解酶系贡献突出的功能微生物。通过实验发现,酱香型大曲的理化指标在一定程度上反映水解酶系的组成以及曲中微生物的种类和数量,为优化制曲工艺和强化大曲的制备提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酱香型大曲是已贮存 6 个月粉碎的成品生产用曲,由贵州省某酿酒有限公司提供。

氢氧化钠、次甲基蓝、葡萄糖、无水乙酸钠、冰乙酸、可溶性淀粉、己酸、无水乙醇、甲醛、乙酸锌、亚铁氰化钾、乙酸铅、无水硫酸钠、无水碳酸钠、三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、原碘液、DNS、羧甲基纤维素钠、半纤维素、聚乙烯醇、磷酸二氢钾、十二水磷酸氢二钠、柠檬酸、柠檬酸钠和绕单宁均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌器:上海博讯实业有限公司医

疗设备厂; ZD-85 多功能汽浴振荡器:金坛市文化仪器有限公司; MJX-250B-Z 型霉菌培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 电热恒温水浴锅:天津市泰斯特仪器有限公司; 超净工作台:苏州市金净净化设备科技有限公司; 721 可见分光光度计:上海菁华科技仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大曲的理化指标及水解酶系测定方法

1.3.1.1 大曲的理化指标测定方法

大曲的酸度、淀粉、水分、还原糖、氨基酸态氮、发酵力、酯化力、糖化力和液化力的测定参照行业标准《酿酒大曲通用分析方法》^[12]。标准规定^[12],水分含量以百分比表示;淀粉含量为每一百克大曲中含有淀粉的质量,单位为 g/100 g;酸度为 10 g 绝干大曲消耗 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液的毫摩尔数,单位为 mmol/10 g;氨基态氮含量单位为 g/kg。标准规定,每 50 g 大曲在 35 °C,经过 7 d 催化己酸和乙醇合成己酸乙酯的毫克数为一个酯化力单位,符号为 U,以(mg/50 g·7 d)表示;在 30 °C、72 h 内 0.5 g 大曲利用可发酵糖类所产生的二氧化碳克数为一个发酵力单位,符号为 U,以(g/0.5 g·72 h)表示;以在 35 °C、pH 4.6 条件下,1 g 绝干曲 1 h 能液化淀粉的克数为一个液化力单位,符号为 U,以(g/g·h)表示;在 35 °C、pH 4.6 条件下,1 g 绝干曲 1 h 转化可溶性淀粉生成葡萄糖的毫克数为一个糖化力单位,符号为 U,以(mg/g·h)表示。

1.3.1.2 大曲中水解酶系测定方法

(1) 大曲酶液的制备

准确称取大曲曲粉 10.00 g 至装有无菌玻璃珠的 90.00 g 无菌生理盐水中,置 40 °C 恒温水浴锅中水浴 1 h,每隔 15 min 搅拌一次,滤纸过滤,所得滤液用于测定酶活。

(2) 酸性、中性蛋白酶测定方法

测定方法参照国标 SB/T 10317-1999。酪氨酸标准曲线方程为: $y=0.0099x+0.0076$ (x 为酪氨酸毫克数, y 为 OD_{660 nm}, R²=0.99920)。

酶活定义: 1 g 大曲在 40 °C, pH 3.0 条件下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酸性蛋白酶活力单位,以 u/g 表示; 1 g 大曲在 40 °C, pH 7.2 条件下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个中性蛋白酶活力单位,以 u/g 表示。

(3) 液化酶测定方法

测定方法采用 Young J. Yoo 改良法^[13]。

酶活定义: 1 g 大曲在 40 °C 时 5 min 内水解 1 mg

淀粉(0.5%淀粉)的酶量为一个活力单位,以 u/g 表示。

(4) 糖化酶测定方法

测定方法采用 DNS 法^[13],葡萄糖标准曲线方程为 $y=0.855x+0.0047$ (x 为葡萄糖毫克数, y 为 OD_{550nm} , $R^2=0.99840$)。

酶活定义: 1 g 大曲在 40 °C, pH 4.6 条件下,每小时水解淀粉产生 1 mg 葡萄糖为一个酶活力单位,以 u/g 表示。

(5) 纤维素酶测定方法

测定方法采用 DNS 法^[13],葡萄糖标准曲线方程为 $y=0.0669x-0.0523$ (x 为葡萄糖毫克数, y 为 OD_{520nm} , $R^2=0.99140$)。

酶活定义: 1 g 大曲在 50 °C, 自然 pH 条件下,每分钟催化纤维素水解生成 1 μ mol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位,以 u/g 表示。

(6) 半纤维素酶测定方法

测定方法采用 DNS 法^[13],葡萄糖标准曲线方程为 $y=0.00052x-0.01143$ (x 为木糖微克数, y 为 OD_{550nm} , $R^2=0.99785$)。

酶活定义: 1 g 大曲在 50 °C、pH 4.8 条件下, 1 min 生成 1 μ g 分子木糖所需酶量为一个酶活力单位,以 u/g 表示。

(7) 果胶酶测定方法

测定方法采用国标 QB 1502-92。

酶活定义: 1 g 大曲在 50 °C, pH 3.5 的条件下, 1 h 分解果胶产生 1 mg 半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位,以 u/g 表示。

(8) 脂肪酶测定方法

测定方法采用国标 GB/T 23535-2009 中电位滴定法。

酶活定义: 1 g 大曲在 40 °C, pH 7.5 的条件下,水解底物生成 1 μ mol 的可滴定的脂肪酸为 1 个酶活力单位,以 u/g 表示。

(9) 单宁酶测定方法

测定方法采用分光光度法^[13],没食子酸标准曲线方程为 $y=73.83516x-1.54374$ (x 为 OD_{520nm} , y 为没食子酸浓度, $R^2=0.99597$)。

酶活定义: 1 g 大曲在 40 °C, pH 5.0 的条件下, 1 min 水解底物没食子酸丙酯产生 1 μ mol 没食子酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位,以 u/g 表示。

(10) 植酸酶测定方法

测定方法采用国标 GB/T 18634-2009,无机磷标准曲线方程为 $y=0.03166x-0.01905$ (x 为无机磷的量, y 为 OD_{415nm} , $R^2=0.99784$)。

酶活定义: 1 g 大曲在 37 °C、pH 5.0 的条件下,

以每分钟能释放 1 nmol 无机磷的酶量定义为一个酶活力单位,以 u/g 表示。

1.3.2 大曲中微生物计数方法

称取已粉碎的 10.00 g 大曲溶于 90 mL 无菌生理盐水中,摇床充分震荡 30 min,取 1 mL 加入到装有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,得到 10^{-2} 稀释液,依次操作得到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释液。按照无菌操作要求,吸取 0.2 mL 稀释液加入培养皿中,再加入温度合适的营养琼脂培养基、孟加拉红培养基、马铃薯琼脂培养基 15 mL~20 mL,摇匀,待凝固后,分别放入 35 °C、28 °C 和 30 °C 培养箱中培养 1 d、2 d 和 2 d,分别对大曲中细菌、酵母菌和霉菌进行计数^[13]。

1.3.3 大曲中细菌产酶方法及酶活测定方法

1.3.3.1 大曲中细菌产酶酶液的制备

将从大曲中分离得到的细菌接种到营养琼脂斜面上 35 °C 培养 1 d,挑取单菌落接种在牛肉膏蛋白胨液体种子培养基,摇床 150 r/min 培养 20 h,以 10% 的接种量接种到麸皮培养基 (15 g 麸皮、15 g 蒸馏水, 121 °C 灭菌 20 min) 35 °C 培养 3 d,称取培养物 10 g 加入 90 g 无菌生理盐水,40 °C 水浴 1 h,每隔 15 min 搅拌一次,滤纸过滤,所得滤液用于测定酶活^[13]。

1.3.3.2 大曲中细菌产酶酶活测定方法

大曲中细菌产酶酶活测定方法参照 1.3.1.2。

1.3.4 大曲中霉菌产酶方法及酶活测定方法

1.3.4.1 大曲中霉菌产酶酶液的制备

将从大曲中分离得到的霉菌接种到马铃薯琼脂斜面上 30 °C 培养 7 d,挑取菌丝接种到马铃薯琼脂试管斜面,30 °C 培养 7 d,用无菌生理盐水洗去试管斜面上的孢子,以 10% 的接种量接种到麸皮培养基 (15 g 麸皮、15 g 蒸馏水, 121 °C 灭菌 20 min) 30 °C 培养 3 d,称取培养物 10 g 加入 90 g 无菌生理盐水,40 °C 水浴 1 h,每隔 15 min 搅拌一次,滤纸过滤,所得滤液用于测定酶活^[13]。

1.3.4.2 大曲中霉菌产酶酶活测定方法

大曲中霉菌产酶酶活测定方法参照 1.3.1.2。

1.4 数据处理

采用 Origin 8.0 软件对理化指标和水解酶系实验数据进行分析,运用 Excel 2007 对微生物产酶试验结果进行整理并用 R 软件进行统计处理,实验重复三次,实验结果用“平均值 \pm 标准偏差”表示。

2 结果与讨论

2.1 酱香型大曲的理化指标

行业标准《酿酒大曲通用分析方法》中规定大曲的酸度、淀粉含量、水分、氨基酸态氮、发酵力、酯

化力、糖化力和液化力作为分析大曲常用的理化指标。酱香型大曲的理化指标测定结果如表 1 所示。

表 1 大曲的理化指标测定结果

Table 1 Physicochemical indices of Daqu

大曲类型	水分/%	淀粉含量 /($\times 10^{-2}$ g/g)	酸度 /($\times 10^{-1}$ mmol/g)	氨基酸态氮/(g/kg)	酯化力/U	发酵力/U	液化力/U	糖化力/U
酱香大曲	7.78 \pm 0.10	62.64 \pm 0.09	1.10 \pm 0.00	4.00 \pm 0.01	14.88 \pm 5.26	0.31 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	186.10 \pm 4.12

大曲中水分是一个重要的指标,水分在制曲过程中与微生物的生长和酶的生成密切相关。实验中测定酱香型大曲的水分含量为 7.78 \pm 0.10%,符合酱香型大曲成品曲水分含量低于 13%这一标准^[14],若大曲中水分含量太高,大曲容易二次生霉,使大曲质量降低。

大曲的淀粉的质量分数与糖化力和液化力的高低有着密切的关系。液化力和糖化力高,就代表着原料中淀粉的利用率就高。但是液化力和糖化力的高低又与大曲中微生物的生长繁殖有一定的关联性,尤其是霉菌。实验中测定大曲中淀粉含量为(62.64 \pm 0.09) $\times 10^{-2}$ g/g,液化力为(0.01 \pm 0.00) U,糖化力为(186.10 \pm 4.12) U;地方标准 DB 52/T871^[14]中规定酱香型大曲中淀粉含量为(53.0~60.0) $\times 10^{-2}$ g/g,糖化力为(100~300) U。成品大曲中残余的淀粉含量很高,这些残余的淀粉在酱香型白酒发酵过程中提供了原料,体现了大曲有投粮这一作用。

大曲的酸度反映了成品大曲自身酸度的大小,大曲酸度的形成主要来源于生酸微生物进行的有机酸代谢以及脂肪、淀粉和蛋白质的降解。实验中测定酱香型大曲的酸度为(1.10 \pm 0.00) $\times 10^{-1}$ mmol/g;地方标准 DB 52/T871^[14]中规定酱香型大曲的酸度为(1.0~3.5) $\times 10^{-1}$ mmol/g。酸度是大曲的一个重要的理化指标,它是大曲中微生物综合作用的结果,适当的酸度会抑制大曲中部分有害杂菌的生长,同时也为有益微生物提供营养和参与酯化反应生成香味物质。

氨基酸态氮含量、酯化力和发酵力作为酱香型大曲生化功能的动态指标,目前还没有标准对酱香型大曲中的这几个指标作出明确规定。本实验中测定酱香型大曲中氨基酸态氮含量为(4.00 \pm 0.01) g/kg,酯化力为(14.88 \pm 5.26) U,发酵力为(0.31 \pm 0.01) U。大曲中氨基酸态氮的含量与大曲中蛋白酶的活力以及微生物的数量和代谢有着密切关系。大曲中氨基酸态氮的含量反映了曲中蛋白酶的活力以及微生物的种类和数量。酱香型大曲的发酵力和酯化力与大曲中微生物的数量和代谢有着密切的关联性,特别是产酒酵母和产酯酵母。

本课题组对酱香型大曲中微生物计数,得到酱香大曲中酵母为 10³ CFU/g,细菌数量为 10⁸ CFU/g,霉

菌数量为 10⁴ CFU/g。高温制曲工艺降低了曲中酵母和霉菌的数量,提高了大曲中细菌的数量,尤其是耐热芽孢杆菌的数量,对于酱香型白酒的生产有着重要意义。

2.2 酱香型大曲的水解酶系测定结果

酱香型大曲是以纯种小麦为原料制备而成,小麦中成分主要为水分、淀粉、蛋白质、脂肪、糖类、纤维素和灰分等。大曲中微生物会代谢产生酶系分解原料供微生物生长利用,而小麦的糊粉层含有单宁和植酸,本实验对水解酶系中酸性蛋白酶、中性蛋白酶、糖化酶、液化酶、纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、脂肪酶、单宁酶和植酸酶进行测定。酱香型大曲的水解酶系测定结果如图 1 所示。

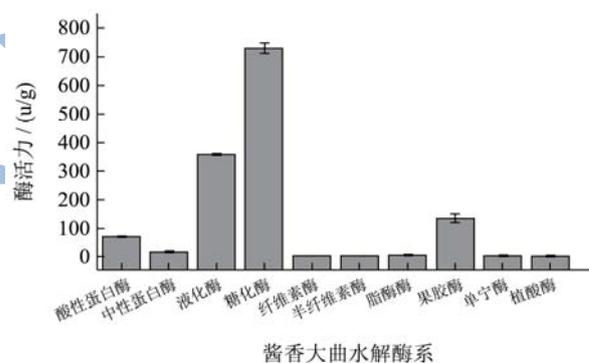


图 1 大曲的水解酶系测定结果

Fig.1 Composition of hydrolyzing enzymes in Daqu

在酱香型大曲水解酶系中,酱香型大曲中水解酶系主要为蛋白酶、淀粉酶和果胶酶。但是在曲中含量较少的纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶、单宁酶和植酸酶也有着重要的作用,它们的地位是不可取代的。研究发现,在白酒酿造中添加一定量的纤维素酶,在不改变酒质的条件下,不但提高了总酯和乙酸乙酯含量,提高了出酒率;并且降低醛类和杂醇油的含量;脂肪酶对脂类物质的生成有着重要的作用,可以提高白酒中总酯的含量;单宁酶可以降低白酒中的苦涩感^[8-11]。

在酱香大曲水解酶系中并未检测到纤维素酶活力,这可能由于酱香型大曲采用高温制曲,而纤维素酶的作用适温为 40~50 °C,当温度高于 60 °C,大曲

中的纤维素酶会迅速钝化。

2.3 酱香型大曲中微生物产酶实验测定结果

酱香型大曲中的水解酶系主要是由大曲中的细菌和霉菌产生的。对筛选鉴定的19株可培养细菌(鉴定均为芽孢杆菌,其中解淀粉芽孢杆菌8株,地衣芽孢杆菌7株,甲基营养型芽孢杆菌2株,枯草芽孢杆菌2株,编号为FBKL1.0185-FBKL1.0203)和17株可培养霉菌(鉴定分别为茶状犁头霉、茶状犁头霉、分枝犁头霉、小孢根霉、卷枝毛霉、卷枝毛霉、总状毛霉、

黄曲霉、阿姆斯特丹散囊菌、构巢曲霉、紫色红曲霉、产黄青霉、普通青霉、普通青霉、宛氏拟青霉、宛氏拟青霉、红色红曲霉,编号为FBKL3.0101-FBKL3.0117)进行产酶研究,结合酱香型大曲主要水解酶系,测定其产酸性蛋白酶、中性蛋白酶、糖化酶、纤维素酶、脂肪酶和果胶酶的能力。酱香型大曲中微生物产酶实验结果如表2和表3所示,运用R软件对微生物产酶试验结果进行统计分析,结果如图2~图5所示。

表2 大曲中细菌菌株产酶结果

Table 2 Enzymes produced by 19 strains of bacteria in Daqu

酶活力/(u/g)	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	糖化酶	纤维素酶	脂肪酶	果胶酶
FBKL1.0185	0.00±0.00	2934.85±30.82	1791.77±42.14	1.76±0.18	7.22±0.00	0.00±0.00
FBKL1.0186	0.00±0.00	638.25±0.75	0.00±0.00	4.40±0.15	1.61±0.00	103.86±11.30
FBKL1.0187	0.00±0.00	1338.20±62.29	1467.66±31.63	1.34±0.10	8.33±4.71	0.00±0.00
FBKL1.0188	0.00±0.00	385.53±14.46	1733.49±27.12	2.22±0.17	8.91±0.35	101.26±13.02
FBKL1.0189	0.00±0.00	1394.96±12.69	433.35±5.47	3.76±0.09	5.25±0.53	352.92±26.27
FBKL1.0190	0.00±0.00	4105.44±27.73	2851.79±65.92	8.96±0.27	15.59±4.64	233.94±35.96
FBKL1.0191	0.00±0.00	574.88±56.35	1502.84±14.76	1.03±0.00	7.41±2.38	221.28±29.52
FBKL1.0192	0.00±0.00	1674.05±59.21	1330.61±15.18	4.35±0.14	8.66±2.45	30.05±6.07
FBKL1.0193	0.00±0.00	1532.85±3.79	1431.96±41.43	2.71±0.24	7.09±0.00	259.33±18.65
FBKL1.0194	0.00±0.00	1243.12±16.40	1162.63±43.34	3.65±0.07	10.69±0.72	44.14±20.81
FBKL1.0195	0.00±0.00	659.58±17.28	1727.77±15.24	1.07±0.00	0.00±0.00	60.35±12.19
FBKL1.0196	57.05±3.76	3003.90±4.17	354.97±41.15	4.84±0.02	0.00±0.00	65.18±13.17
FBKL1.0197	0.00±0.00	3620.85±8.14	2339.86±18.70	3.02±0.08	8.05±0.52	58.93±6.41
FBKL1.0198	0.00±0.00	503.32±30.72	1380.27±43.00	4.94±0.41	0.00±0.00	797.87±27.52
FBKL1.0199	0.00±0.00	136.12±20.73	1425.20±22.77	4.77±0.08	0.00±0.00	198.11±20.50
FBKL1.0200	0.00±0.00	837.76±10.84	74.13±34.94	2.85±0.06	6.15±1.93	156.75±17.97
FBKL1.0201	0.00±0.00	2051.12±19.78	1425.23±55.10	1.93±0.12	0.00±0.00	108.29±0.00
FBKL1.0202	0.00±0.00	3077.02±10.65	2459.84±8.70	2.27±0.10	4.77±0.62	157.58±41.79
FBKL1.0203	16.09±0.71	364.50±41.74	1982.59±31.29	5.02±0.20	0.00±0.00	169.96±37.56

表3 大曲中霉菌菌株产酶结果

Table 3 Enzymes produced by 17 strains of mold in Daqu

酶活力/(u/g)	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	糖化酶	纤维素酶	脂肪酶	果胶酶
FBKL3.0101	0.00±0.00	26.90±2.34	1001.36±12.85	2.93±0.01	0.00±0.00	161.40±43.18
FBKL3.0102	68.38±2.47	16.50±4.32	909.13±32.41	2.79±0.05	3.09±0.80	151.29±19.45
FBKL3.0103	45.04±3.54	49.08±0.71	1041.69±24.86	2.99±0.19	28.84±1.68	79.13±37.30
FBKL3.0104	104.75±2.44	82.86±2.44	2538.80±21.41	5.87±0.10	22.69±8.98	169.61±51.40
FBKL3.0105	53.22±1.52	4.23±0.76	1549.70±36.69	3.93±0.06	2.12±1.20	67.94±16.01
FBKL3.0106	132.60±5.95	18.15±1.32	325.44±2.89	3.61±0.10	20.61±2.60	304.60±13.90
FBKL3.0107	12.46±5.67	107.15±0.71	1637.75±6.21	3.82±0.04	27.23±6.70	252.94±59.62
FBKL3.0108	49.23±1.47	1384.96±14.68	3968.07±48.24	4.85±0.02	9.81±4.05	109.17±77.19
FBKL3.0109	199.10±8.80	3190.57±24.01	604.95±56.10	5.36±0.16	11.14±1.89	416.58±84.16

转下页

接上页

FBKL3.0110	82.26±4.16	1681.23±24.95	1474.01±58.31	5.47±0.02	0.00±0.00	185.57±26.24
FBKL3.0111	34.16±0.60	571.78±4.84	777.74±2.65	4.43±0.09	28.64±5.72	224.92±31.81
FBKL3.0112	0.00±0.00	6.14±3.13	902.08±2.74	3.95±0.03	6.98±3.45	186.26±32.93
FBKL3.0113	0.00±0.00	721.98±5.15	1608.76±31.01	5.12±0.10	15.77±2.53	334.96±33.84
FBKL3.0114	0.00±0.00	39.58±1.91	659.34±27.92	3.27±0.08	29.81±2.01	355.39±33.50
FBKL3.0115	0.00±0.00	9.03±1.35	1985.45±11.87	1.95±0.15	22.26±3.74	221.66±21.37
FBKL3.0116	49.64±0.70	0.00±0.00	2515.75±33.88	2.19±0.02	14.88±4.98	193.45±44.36
FBKL3.0117	26.42±2.56	778.85±13.63	2607.88±44.79	6.56±0.15	24.68±4.03	601.91±44.80

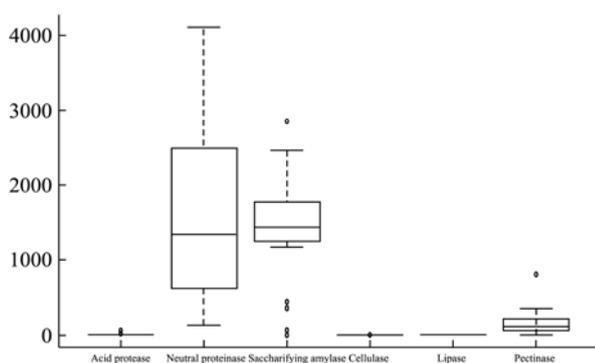


图 2 19 株细菌产酶的箱线图

Fig.2 Box plot of the enzymes produced by 19 strains of bacteria in Daqu

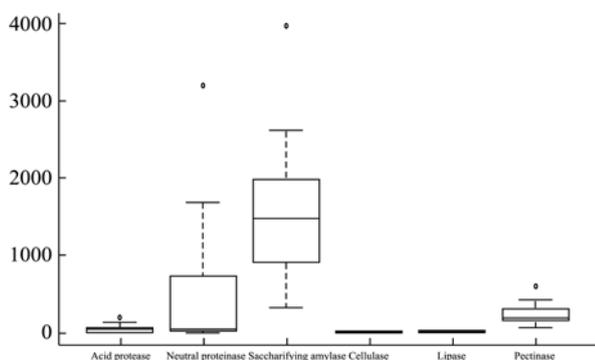


图 3 17 株霉菌产酶的箱线图

Fig.3 Box plot of the enzymes produced by 17 strains of mold in Daqu

图 2 为 19 株细菌产酶能力的箱线图，图 3 为 17 株霉菌产酶能力的箱线图。从图 2 可以看出，酱香型大曲中细菌产中性蛋白酶和糖化酶能力较强，其中产中性蛋白酶能力高于产糖化酶能力；不同水解酶系所对应的箱线图的大小以及箱线图上的孤立点说明大曲中不同细菌产酶能力差异较大。从图 3 可以看出，霉菌产中性蛋白酶、糖化酶能力较强，其中产糖化酶能力高于产中性蛋白酶能力；不同水解酶系所对应的箱线图的大小以及箱线图上的孤立点说明大曲中不同霉菌产酶能力差异较大。

图 4 为 19 株细菌产酶能力的星形图，图 5 为 17 株霉菌产酶能力的星形图。图 4 中每个星形图代表每

株细菌产水解酶系的相对酶活力信息，图 5 中每个星形图代表每株霉菌产水解酶系的相对酶活力信息。星形图中的扇形代表着水解酶系的种类，用不同颜色区分；用扇形的半径来代表水解酶系相对酶活力大小，扇形半径越长则代表此扇形所对应酶系的相对酶活力越大。

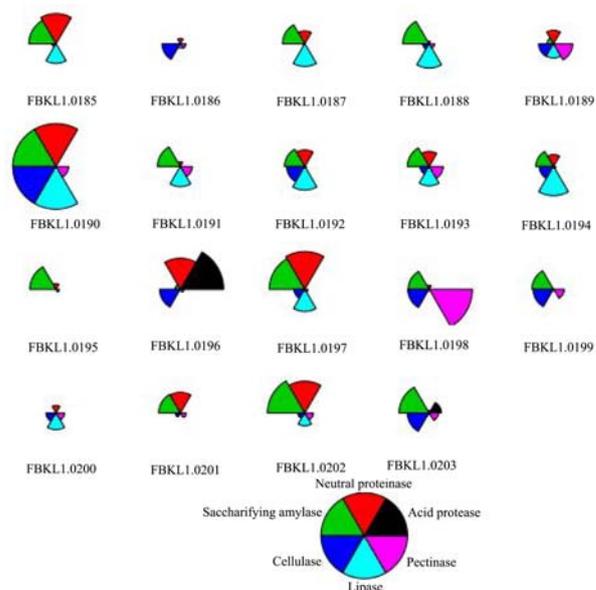


图 4 19 株细菌产酶星形图

Fig.4 Star map of the enzymes produced by 19 strains of bacteria in Daqu

19 株细菌中只有 FBKL1.0196 和 FBKL1.0203 两株细菌产酸性蛋白酶，分子鉴定均为枯草芽孢杆菌，酶活力分别为(57.05±3.76) u/g、(16.09±0.71) u/g，其活力均低于酱香大曲中酸性蛋白酶的活力(68.83±0.56) u/g。19 株细菌均产中性蛋白酶和纤维素酶，绝大部分细菌可产糖化酶、脂肪酶和果胶酶，且产酶能力差异较大。FBKL1.0190 经分子鉴定为甲基营养型芽孢杆菌，产中性蛋白酶、糖化酶、纤维素酶和脂肪酶能力最强，其中中性蛋白酶活力为(4105.44±27.73) u/g、糖化酶活力为(2851.79±65.92) u/g、纤维素酶活力为(8.96±0.27) u/g、脂肪酶活力为(15.59±4.64) u/g。甲基营养型芽孢杆菌 FBKL1.0190 产中性蛋白酶能力高于

王婧等人报道的酱香型大曲中高产蛋白酶功能细菌(产中性蛋白酶活力 3925.80 u/g)^[15]; 产糖化酶和纤维素酶能力高于王晓丹报道的酱香型大曲中功能细菌 FBKL1.0151, 而产脂肪酶能力与功能细菌 FBKL1.0151 相当^[13]。

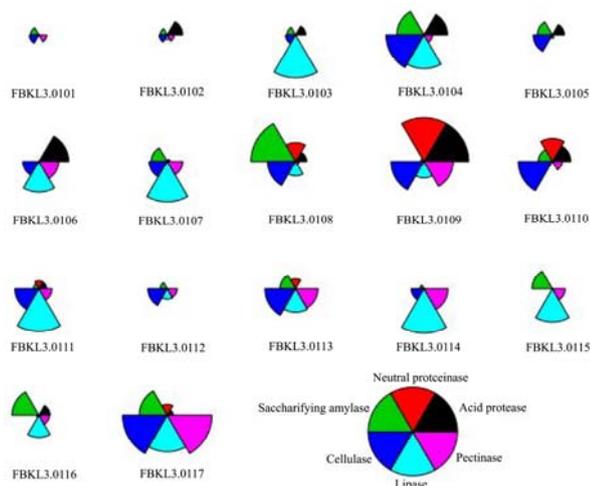


图 5 17 株霉菌产酶星形图

Fig.5 Star map of the enzymes produced by 17 strains of mold in Daqu

绝大多数的霉菌都产酸性蛋白酶和中性蛋白酶, 但产酶能力差异较大, 其中 FBKL3.0109 菌株为阿姆斯特丹散囊菌, 产酸性蛋白酶和中性蛋白酶能力最高, 酶活力分别为(199.10±8.80) u/g 和(3190.57±24.01) u/g 对曲中蛋白酶类贡献最大。这与报道的霉菌中毛霉、根霉和曲霉都可以产酸性蛋白酶一致。FBKL3.0108, FBKL3.0109, FBKL3.0110 菌株分子鉴定为黄曲霉、阿姆斯特丹散囊菌、构巢曲霉, 其产中性蛋白酶酶活力分别为(1384.96±14.68) u/g、(3190.57±24.01) u/g 和(1681.24±24.95) u/g, 其产酶能力均高于班世栋报道的皮落青霉的产酶能力(产糖化酶酶活为 748 u/g)^[16], 实验表明曲霉属对大曲中中性蛋白酶酶系贡献最大。17 菌霉菌菌株均可以产糖化酶、纤维素酶、脂肪酶和果胶酶, 并且菌株酶活差异较大, 其中 FBKL3.0108 菌株产糖化酶最大, 酶活力为(3968.06±48.24) u/g; 其中 FBKL3.0117 菌株为红色红曲霉, 产纤维素酶和果胶酶能力最强, 纤维素酶活力为(6.56±0.15) u/g, 果胶酶活力为(601.91±44.80) u/g。

表 4 为酱香型大曲中水解酶系与微生物类别之间的关系。在酱香大曲中细菌和霉菌产酶实验中发现, 细菌和霉菌产中性蛋白酶、糖化酶和果胶酶的能力高于产酸性蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶的能力, 这与酱香型大曲中主要的水解酶系为蛋白酶、淀粉酶和果胶酶实验结果一致。通过酱香型大曲的细菌和霉菌产酶实验, 可以找出大曲中的微生物和大曲中的水解酶系

之间的关系, 通过对大曲中水解酶系的大小, 可以判断大曲中微生物的种类和数量。

表 4 水解酶系与微生物之间的关系

Table 4 Relationship between hydrolyzing enzymes and microorganisms

水解酶系	产该水解酶系的微生物
酸性蛋白酶	曲霉、毛霉、青霉
中性蛋白酶	曲霉、芽孢杆菌、青霉
糖化酶	曲霉、根霉、青霉
纤维素酶	曲霉、根霉、芽孢杆菌
脂肪酶	犁头霉、曲霉、毛霉
果胶酶	曲霉、青霉、芽孢杆菌

注: 微生物按照产酶能力强弱先后排列。

3 结论

3.1 酱香型大曲的理化指标符合地方标准 DB 52/T 871 中的规定, 理化指标中水分、酸度、淀粉含量、液化力和糖化力反映酱香型大曲是否成熟; 氨基态氮含量、发酵力和酯化力是酱香型大曲的生化性能, 反映了酱香型大曲品质。酱香大曲中水解酶系主要为蛋白酶、淀粉酶和果胶酶, 曲中含有微量的纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶、单宁酶和植酸酶也有着极其重要的作用, 它们的地位是不可取代的。

3.2 酱香型大曲水解酶系主要是由大曲中细菌和霉菌产生的, 大曲的水解酶系和大曲中细菌和霉菌的种类和数量存在着必然联系。对从酱香型大曲中已分离鉴定的 19 株细菌和 17 株霉菌进行产酶实验, 结果发现 19 株细菌和 17 株霉菌产酶能力差异很大; 枯草芽孢杆菌和阿姆斯特丹散囊菌产酸性蛋白酶能力最强, 曲霉属和甲基营养型芽孢杆菌产中性蛋白酶能力最强, 根霉和黄曲霉产糖化酶能力最强。酱香型大曲水解酶系在某种程度可以反映大曲中微生物的种类和数量。

3.3 通过对酱香型大曲的水解酶系和微生物之间的关系研究, 研究发现甲基营养型芽孢杆菌 FBKL1.0190、黄曲霉 FBKL3.0108 和阿姆斯特丹散囊菌 FBKL3.0109 对酱香型大曲水解酶系贡献比较突出。将这些功能菌株添加到酱香大曲制备中, 用于提高酱香型大曲的品质, 但是如何控制添加功能菌株的量需要试验进一步研究。

参考文献

[1] Kenneth B Raper, Dorothy I Fennell. The Genus *Aspergillus* [M]. The Waverly Press, Inc, 1965
 [2] Wang C, Shi D, Gong G. Microorganisms in Daqu: a

- starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2183-2190
- [3] Zheng X W, Tabrizi M R, Nout M J, et al. Daqu-A traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90
- [4] Wu Q, Chen L, Xu Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavor liquor [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(2): 323-330
- [5] Zheng X W, Yan Z, Han B Z, et al. Complex microbiota of a Chinese "Fen" liquor fermentation starter (Fen-Daqu), revealed by culture-dependent and culture-independent methods [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 293-300
- [6] Chen B, Wu Q, Xu Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 179: 80-84
- [7] Li X R, Ma E B, Yan L Z, et al. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146: 31-37
- [8] 吴华昌, 由耀辉, 卢中明, 等. 脂肪酶应用于白酒催陈的初探[J]. 中国酿造, 2001, 3: 75-77
WU Hua-chang, YOU Yao-hui, LU Zhong-ming, et al. Application of lipase in the aging of liquor [J]. China Brewing, 2001, 3: 75-77
- [9] 王传荣, 沈洪涛. 纤维素酶和 TH-AADY 在浓香型大曲酒丢糟中的应用[J]. 酿酒科技, 2007, 2007(12): 47-49
WANG Chuan-rong, SHEN Hong-tao. Application of cellulase and TH-AADY in spent grains of Luzhou-flavor Daqu liquor [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007, 2007(12): 47-49
- [10] Scalbert. Antimicrobial properties of tannins [J]. Phytochemistry, 1991, 30(12): 3875-3884
- [11] Menke K H, Leinmuller E. Tannins in ruminant feeds. 3. Ineffets [J]. Ubersichten Zur Tierernahrung, 1991, 19: 71-85
- [12] QB/T 4257-2011, 酿酒大曲通用分析方法[S]
QB/T 4257-2011, General methods of analysis for Daqu [S]
- [13] 王晓丹, 胡宝东, 班世栋, 等. 酱香型大曲酶系与大曲中微生物产酶关系的研究[J]. 酿酒科技, 2015, 9: 1-7
WANG Xiao-dan, HU Bao-dong, BAN Shi-dong, et al. The relations between enzyme system in Jiangxiang Daqu and enzyme produced by microbial metabolism [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 9: 1-7
- [14] DB 52/T 871-2014, 酱香型白酒酿酒用大曲[S]
DB 52/T 871-2014, Jiang-flavour Chinese liquor Daqu starter [S]
- [15] 王婧, 王晓丹, 罗晓叶, 等. 酱香大曲中高产蛋白酶功能细菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2015, 34(10): 43-46
WANG Jing, WANG Xiao-dan, LUO Xiao-ye, et al. Screening and identification of functional bacteria with high-yield protease from Moutai-flavor Daqu [J]. China Brewing, 2015, 34(10): 43-46
- [16] 班世栋. 酱香大曲中霉菌菌群和酶系研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015
BAN Shi-dong. Study on moulds taxa and enzyme system in Moutai-flavor Daqu [D]. Guiyang: Guizhou University, 2015